

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND****PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D. 06 NOV 2000	
WIPO	PCT

EP 00/19839

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 199 49 000.7

**Anmeldetag:** 11. Oktober 1999

**Anmelder/Inhaber:** BASF AG, Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:** PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

**IPC:** C 12 N, A 01 H, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Nietiedt

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz die Nukleotidabfolge SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 aufweist.
2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 gemäß Anspruch 1 oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer PRPP-Amidotransferase besitzt.
3. Protein mit PRPP-Amidotransferase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 darstellt.
4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 100 - 450 aus SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 enthält.
5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 dargestellte Sequenz enthält.
6. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenz gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft ist und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase bewirkt, führt.
7. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung.
8. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung.

2

9. Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden hergestellt durch zusätzliche Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 in Sense- oder Antisense-Orientierung.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

## PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher PRPP-Amidotransferase (Phosphoribosyl-pyrophosphat-Amidotransferase, E.C. 2.4.2.14) als ~~neues Ziel für herbizide Wirkstoffe~~. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen kodierend für ein Polypeptid mit PRPP-Amidotransferase Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit PRPP-Amidotransferase Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 kodierend für pflanzliche PRPP-Amidotransferase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase, sowie zur Herstellung von Pflanzen mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden.

Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

25 Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Nukleotide werden in Pflanzen de novo synthetisiert. Als Bestandteil der Nukleinsäuren kommt ihnen besondere Bedeutung zu. In kovalenter Bindung aktivieren Nukleotide Kohlenhydrate für die Biosynthese von Polysacchariden. Ferner aktivieren sie Kopfgruppen für die Biosynthese von Lipiden. Nukleotide sind in nahezu alle Stoffwechselwege eingebunden. Nucleosidtriphosphate, vor allem ATP, treiben die meisten energieaufwändigen Reaktionen der Zelle. Adenin-  
30 nukleotide sind darüber hinaus auch als Komponente in essentiellen Faktoren wie Coenzym A, sowie Nicotinamid- und Flavin-Coenzymen zu finden, die an vielen zellulären Reaktionen beteiligt sind. Die gekoppelte Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) definiert für diverse zelluläre Prozesse, wie Proteintranslation, Microtubuli-Assemblierung, vesikulären  
40 Transport, Signaltransduktion und Zellteilung eine Reaktionsrichtung. Ferner stellen Nukleotide die Ausgangsmetabolite zur Biosynthese von Methylxanthinen wie Coffein und Theobromin in Pflanzenfamilien der Rubiaceae und Theaceae dar.

45 Gene, die für PRPP-Amidotransferase kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen isoliert.

CDNAs die für PRPP-Amidotransferase Enzyme codieren konnten aus diversen bakteriellen, tierischen und pflanzlichen Organismen isoliert und charakterisiert werden. Pflanzliche PRPP-Amidotransferase cDNAs wurden über Komplementation von *E. coli* purF-Mutanten sowie über DNA-Hybridisierungstechniken aus *Glycine max*, *Vigna aconitifolia* sowie aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Ito et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533; Kim et al., The Plant Journal 7(1995), 77-86). Sequenzhomologien deuten darauf hin, daß die codierten Enzyme, ebenso wie PRPP-Amidotransferase aus *E. coli* 4Fe-4S-Cluster enthalten. Die im Vergleich zu *E. coli* N-terminal verlängerten PRPP-Amidotransferase Aminosäuresequenzen aus Pflanzen ähneln plastidären Signalsequenzen.

In Pflanzen finden sich mehrere PRPP-Amidotransferase Isoenzyme, die differentiell exprimiert werden. Die RNA für AtATase1 aus *Arabidopsis thaliana* akkumuliert beispielsweise präferentiell in den Wurzeln, während die AtATase2-Transkripte stärker in jungen Blättern und Blüten gefunden wird (Ito et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533). In *Vigna aconitifolia* akkumuliert eine PRPP-Amidotransferase RNA hauptsächlich in Wurzelknöllchen und wird in Wurzelgeweben durch L-Glutamin induziert (Kim et al., The Plant Journal 7(1995), 77-86).

Da Pflanzen auf einen effektiven Nukleotidstoffwechsel angewiesen sind, läßt sich annehmen, daß sich die beteiligten Enzyme als Ziel für Herbizide eignen. So wurden bereits Wirkstoffe beschrieben, welche die pflanzliche de novo Purinbiosynthese inhibieren. Beispielhaft ist der Naturstoff Hydanthocidin zu nennen, welcher nach Phosphorylierung in planta die Adenylosuccinat-Synthetase (ASS), inhibiert (Siehl et al., Plant Physiol. 110(1996), 753-758).

Inhibitoren für Enzyme der Purin-Biosynthese sind darüber hinaus für ihre pharmakologische Wirkung in Tieren und Mikroorganismen bekannt: Folat-Analoga inhibieren unter anderem das Enzym GAR-Transformylase und wirken antiproliferativ, antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Mycophenolsäure (MPA) wirkt als Hemmstoff der IMP-Dehydrogenase im GMP-Syntheseweg antimikrobiell, antiviral und immunsuppressiv (Kitchin et al., Journal of the American Academy of Dermatology 37(1997), 445-449).

Bakterielle PRPP-Amidotransferase kann beispielsweise durch Glutaminantagonisten, wie Azaserin, 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin (DON) oder L-2-Amino-4-Oxo-5-Chlorpentansäure sowie durch Mercaptopurine und Thioquanosine gehemmt werden. Glutaminantagonisten sind nicht spezifisch für PRPP-Amidotransferase und wirken auch auf andere Enzyme der Purinbiosynthese, wie z.B. die Formylglycinami-

dinribotid-Synthase. Ein Nachweis der Wirksamkeit von Glutaminantagonisten auf pflanzliche PRPP-Amidotransferase steht noch aus.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß PRPP-Amidotransferase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für das Enzym PRPP-Amidotransferase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die
- 10 Herstellung eines effizienten und einfachen PRPP-Amidotransferase Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

- 15 Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung von Genen, die für das pflanzliche Enzym PRPP-Amidotransferase kodieren, der Herstellung von Antisensekonstrukten der PRPP-Amidotransferase, sowie der funktionellen Expression der PRPP-Amidotransferase in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen.

- 20 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Isolierung von Vollängen-cDNAs codierend für funktionelle PRPP-Amidotransferase (E.C.2.4.2.14) aus Tabak (*Nicotiana tabacum*).

- 25 Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase aus Tabak, siehe Beispiel 1.

- 30 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 abgeleitet sind oder mit einer dieser Sequenzen hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer PRPP-Amidotransferase besitzt.

- 35 Tabakpflanzen der Linie *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, die ein Antisensekonstrukt der PRPP-Amidotransferase tragen, wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung, sowie ein Ausbleichen der Blätter.
- 40 Die transgenen Linien sowie die Nachkommen der 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte PRPP-Amidotransferase RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Ferner konnte durch Messung der
- 45 Enzymaktivität eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte Menge der PRPP-Amidotransferase Aktivität in den transgenen Linien detektiert werden, siehe Beispiel 7. Es läßt sich eine

Korellation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der PRPP-Amidotransferase Aktivität feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist PRPP-Amidotransferase erstmals eindeutig als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

5

Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die kom-

10 plette cDNA-Sequenz der PRPP-Amidotransferase aus Tabak in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in E. coli überexprimiert, siehe Beispiel 2.

Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine  
15 DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID NO. 3 beispielsweise in anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugetierzellen exprimiert werden, siehe Beispiel 4.

20 Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte PRPP-Amidotransferase Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die PRPP-Amidotransferase spezifischen Hemmstoffen.

25 Dazu kann die pflanzliche PRPP-Amidotransferase beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der PRPP-Amidotransferase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aus-  
30 sage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen, siehe Beispiel 3.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, repro-  
35 duzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

40

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferasen, mit potentiell herbizider Wirkung indem man das Gen einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase kloniert, in einer geeigneten Expres-  
45 sionskassette - beispielsweise in Insektenzellen - zur Überexpression bringt, die Zellen öffnet und den Zellextrakt direkt bzw. nach Anreicherung oder Isolierung des Enzyms PRPP-Amido-

## 5

transferase in einem Testsystem zur Messung der Enzymaktivität in Gegenwart von niedermolekularen chemischen Verbindungen einsetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

~~Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung können als Defolianten, Desiccants, Krautabtötungsmittel und insbesondere als Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von der angewandten Menge ab.~~

Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung können beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:

20 Dikotyle Unkräuter der Gattungen:

Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia,

25 Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen:

Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, 30 Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

35 Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine PRPP-Amidotransferase aus Tabak oder deren funktionelles Äquivalent kodieren. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.

40 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, 45 einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für



das PRPP-Amidotransferase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

~~Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten PRPP-Amidotransferase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.~~

20

Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 von 40 bis 100 % aufweisen.

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 von 60 bis 100 % aufweisen.

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID No. 3 von 80 bis 100 % aufweisen.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

## 7

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine PRPP-Amidotransferase kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von ausreichenden Mengen des Enzyms PRPP-Amidotransferase eingesetzt werden.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus Tabak gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No. 4 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit PRPP-Amidotransferase Aktivität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit PRPP-Amidotransferase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak PRPP-Amidotransferase mit den SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID NO. 4 von 20 - 100 % Identität.

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit PRPP-Amidotransferase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu den Tabak PRPP-Amidotransferasen mit den Sequenzen SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID NO. 4 von 50 - 100 % Identität.

Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit PRPP-Amidotransferase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu den Tabak PRPP-Amidotransferasen mit den Sequenzen SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID NO. 4 von 80 - 100 % Identität.

Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase sind.

5

Durch Überexpression der für eine PRPP-Amidotransferase kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten PRPP-Amidotransferase Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden.

15 Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des PRPP-Amidotransferase Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der PRPP-Amidotransferase an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

20 Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 tolerant gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase

25 geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.

Eine Veränderung des Nukleotidgehaltes in Pflanzen kann in verschiedenen Fällen von Nutzen sein. Säuglingsnahrungsprodukten auf pflanzlicher Basis werden beispielsweise Nukleotide zugesetzt, um

35 eine der Muttermilch entsprechende Nährstoffzusammensetzung zu erreichen. Weiterhin wäre ein optimierter Nukleotidgehalt im Falle der enteralen Ernährung von Patienten sinnvoll. Ein reduzierter Purin-Nukleotidgehalt in ernährungsrelevanten Pflanzen ist für die diätetische Ernährung Gicht-kranker Patienten relevant. Nukleotide wirken ferner geschmacksbildend und geschmacksverstärkend, so daß sich ein veränderter Nukleotidgehalt auf geschmackliche Eigenschaften von Pflanzen auswirkt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Pflanzen, die nach

45 Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in der Pflanze einen modifizierten Gehalt an Purinnukleotiden aufweisen. Dabei wird vorzugsweise der Gehalt der Purinnukleotide IMP, AMP

und/oder GMP bzw. deren Di- bzw. Trinukleotide ADP, ATP oder GDP, GTP erhöht.

Eine Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden wird  
5 beispielsweise durch Expression einer zusätzlichen DNA-Sequenz  
SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in sense- oder antisense-Orientie-  
rung in der Pflanze hergestellt. Modifizierter Gehalt an Purinnu-  
kleotiden bedeutet, daß sowohl Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an  
Purinnukleotiden bei sense-Orientierung als auch Pflanzen mit er-  
10 niedrigtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung  
(Cosuppression) oder antisense-Orientierung hergestellt werden  
können.

Erhöhung des Gehaltes an Purinnukleotiden bedeutet beispielsweise  
15 im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene  
Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung für Purinnukleotide  
durch funktionelle Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens  
in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten  
Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung pflanz-  
licher PRPP-Amidotransferase zur Veränderung der Konzentrationen  
von Methylxanthinen in Pflanzen.

25 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den  
Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das En-  
doplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechen-  
der operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Ent-  
stehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant  
30 Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den  
Pflanzen-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden, siehe  
Beispiel 5.

35 Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist  
grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von  
Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man  
insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der  
40 einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der  
CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al.,  
Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche  
Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer  
Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des  
45 eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989),  
2195-2202).

## 10

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen PRPP-Amidotransferase Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren  
5 wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzier-  
10 barer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die  
15 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kar-  
20 toffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094).  
25 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

30 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine PRPP-Amidotransferase kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-  
40 Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Gehaltes an Purinnukleotiden in der Pflanze durch Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in Kultur-  
5 pflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die PRPP-Amidotransferase Aktivität auf-  
weisen oder durch ~~in vitro~~-Selektion ermittelt werden. Besonders  
geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung  
10 einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

15

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches PRPP-Amidotransferase Polypeptid oder ein funktionell äquivalen-  
20 ter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf PRPP-Amidotransferase Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regula-  
25 tive Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das PRPP-Amidotransferase Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die  
30 Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb  
35 der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrich-  
40 tung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnitt-  
45 stellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Trans-

## 12

versionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerre-pair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden  
5 der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine PRPP-Amidotransferase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in  
15 "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press, Kapitel 6/7, 71-119) beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen  
25 Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die  
30 Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und  
35 R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res.  
40 12 (1984), 8711).

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide,  
45 Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen

## 13

verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

- 5 Der Biosyntheseort von Purinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des PRPP-Amidotransferase Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Purin-Bio-  
synthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern  
auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in  
10 fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen PRPP-Amidotransferase Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

15

- Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung  
25 einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des PRPP-Amidotransferase Gehaltes in der Pflanze.

- 30 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

35

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

## Beispiele

40

Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

## Allgemeine Klonierungsverfahren

45



Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

#### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

10

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(1977), 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

#### Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben:

- 20 Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. 163(1987), 21) isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt ( Anal. Biochem. 152(1986), 304). Die als Sonde eingesetzten DNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) radioaktiv markiert und nach Standardmethoden hybridisiert (Siehe Hybond-Benutzerhinweise, Amersham). Hybridisierungssignale wurden durch Autoradiographie mithilfe von X-OMAT AR Filmen der Fa. Kodak sichtbar gemacht.

- Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden mit aufbereitetem, pyrogenfreiem Wasser, im weiteren Text als H<sub>2</sub>O bezeichnet, aus einer Milli-Q Water System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) angesetzt. Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weinstadt), Pharmacia (Freiburg) Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben verwendet.

## 15

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-1 Blue) wurden von Stratagene bezogen. E. coli AT 2465 wurde bei dem coli genetic stock centre (Yale University, New Haven) bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777). Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984), 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230) benutzt werden.

## 15 Beispiel 1

Isolierung von cDNAs codierend für eine funktionelle PRPP-Amido-transferase aus Tabak.

- 20 Zur Isolierung von für PRPP-Amidotransferase codierenden cDNAs aus *Nicotiana tabacum* wurde ein für PRPP-Amidotransferase codierender cDNA-Klon aus *Arabidopsis* (AtATase1; Ito et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533; GenBank Accession number D28868) als Matrize zur Erzeugung einer Hybridisierungs-  
25 mittels PCR verwendet.

Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/ $\mu$ l Matrizen DNA, 0,5  $\mu$ M der Oligonukleotide 5'-cgc tct aga act agt gga tc-3' und 5'-tcg agg tcg acg gta tc-3', 200  $\mu$ M Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50  
30 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25 °C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0.02 U/ $\mu$ l Taq Polymerase (Perkin Elmer).

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

- |                           |             |
|---------------------------|-------------|
| 35 Anlagerungstemperatur: | 50°C, 1 min |
| Denaturierungstemperatur: | 94°C, 1 min |
| Elongationstemperatur:    | 72°C, 2 min |
| Anzahl der Zyklen:        | 30          |

- 40 Das resultierende Fragment von 1,9 kb wurde für ein heterologes Screening einer cDNA Bank von *Nicotiana tabacum* var. SR-1 (Stratagene) verwendet. Es wurden  $3,0 \times 10^5$  Lambda Phagen der cDNA-Bibliothek auf Agarplatten mit E. coli XL1-blue als Bakterienstamm ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren  
45 (Sambrook et al. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nitrocellulosefilter (Gelman Sciences) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungs-

diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe des "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurden. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach Prähybridisierung bei 60°C in 3 x SSPE, 0,1% Natriumdodecylsulfat (w/v), 0,02% Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02% Ficoll 400 (w/v) und 50 mg/ml Kalbsthymus DNA für ca. 12 Stunden. Anschließend wurden die Filter 60 Minuten in 2 x SSPE, 0,1% Natriumdodecylsulfat (w/v) bei 60°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und mittels Standardtechniken vereinzelt (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) und in Plasmide überführt (Strategene).

15 Nach Restriktions- und Sequenzanalyse konnten zwei unterscheidbare Klone Ntpur1.1 (Klon 7.2) enthaltend die DNA- Sequenz SEQ-ID No. 1 und Ntpur1.2 (Klon 9.2) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 identifiziert werden, welche Leseraster mit Homologie zu AtATase1 aus *Arabidopsis thaliana* codieren. Die Aminosäuresequenzen von Ntpur1.1 (SEQ-ID No. 2 - Länge: 573 Aminosäuren) und Ntpur1.2 (SEQ-ID No. 4 - Länge: 573 Aminosäuren) sind zu 97 % identisch, siehe Tabelle 1. Die Homologie auf Aminosäureebene zu AtATase1 beträgt für Ntpur1.1 81 % und für Ntpur1.2 85 %. Die durchgehenden Leseraster beginnen mit Nukleotidbase 49 (Ntpur1.1) bzw. 25 (Ntpur1.2) und werden in Polypeptide von 573 Aminosäuren Länge übersetzt .

Tabelle 1

30 Aminosäurevergleich Ntpur1.1 x Ntpur1.2:

```

1 MAATVSTASAAATNKYPLSQPLDKPFCSPSQKLLSLSPKTLPKPYRTLTV 50
  |||
1 MAATVSTASAAATNKYPLSQPLDKPFCSPSQKLLSLSPKTHPKPYRTLIT 50
  .
35 51 ASSKNPLNDVVSFKKSADNTLDSYFDDDDKPREECGVVGIIYGDSEASRLC 100
  |||:|||||:|||||
51 ASSKNPLNDVISFKKSADNTLDSYFDDDDKPREECGVVGIIYGDSEASRLC 100
  .
40 101 YLALHALLHRGQEGAGIVAVNDDVLKSITGVGLVSDVFNESKLDQLPGDM 150
  |||
101 YLALHALQHRGQEGAGIVAVNDDVLKSITGVGLVSDVFNESKLDQLPGDM 150
  .
151 AIGHVWYSTAGSSMLKNVQPFVANYKFGSVGVAHNGNLVNYKLLRGELEE 200
  |||
151 AIGHVRYSTAGSSMLKNVQPFVASYKFGSVGVAHNGNLVNYKLLRSELEE 200
  .
45 201 NGSIFNTSSDTEVVLHLIAISKARPFLLRIVEACEKIEGAYSMVFVTEDEK 250
  |||
201 NGSIFNTSSDTEVVLHLIAISKARPFLLRIVEACEKIEGAYSMVFVTEDEK 250
  .
251 LVAVRDPHGFRPLVMGRRSNGAVVFASSETCALDLIEATYEREVNPGEVVV 300

```

17

```

|||||
251 LVAVRDPHGFRPLVMGRRSNGAVVFASETCALDLIEATYEREVNPGEVVV 300
301 VDKDGVHSHIYLMPHPEHKSCIFEHIYFALPNSVVFGRSVYESRRAFGEIL 350
|||||
5 301 VDKDGVQSICLMPHPERKSCIFEHIYFALPNSVVFGRSVYESRRAFGEIL 350
351 ATEAPVECDVGIAPVDSGIVAALGYAAKAGVPPQQGLIRSHYVGRTFIEP 400
|||||
351 ATEAPVECDVVIAPVDSGVVAALGYAAKAGVPPQQGLIRSHYVGRTFIEP 400
10 401 SQKIRDFGVKLLKLSVPRALLEGKRVVVVDDSIVRGTTSSKIVRLLKEAGA 450
|||||
401 SQKIRDFGVKLLKLSVPRAVLEGKRVVVVDDSIVRGTTSSKIVRLLKEAGA 450
451 KEVHMRIASPPIIASCYYGVDTPSSDELISNRMSVEEIKEFIGSDSLAFL 500
|||||
15 451 KEVHMRIASPPIIASCYYGVDTPSSDELISNRMSVEEIKEFIGSDSLAFL 500
501 PMDSLNLKLLGNDKSKFCYACFSGNYPVEPTGKVKRIGDFMDDGLSGDMDS 550
|||||
501 PMDSLNLKLLGNDKSKFCYACFSGNYPVEPTGKVKRIGDFMDDGLSGDMDS 550
551 IDGGWLPGSSRVQKTILNEVRTG 573
20 |||||
551 IDGGWLPGSSRVQKTILNEVRTS 573

```

Die pflanzlichen Proteine (Ntpur1.1, Ntpur1.2, AtATase1) weisen gegenüber PRPP-Amidotransferase Sequenzen von Bakterien und Mensch einen verlängerten N-Terminus mit einem großen Anteil ba-

25 sischer Aminosäuren auf (Tabelle 2), was auf die Funktion eines Transitpeptides für den plastidären Import hinweist (von Heijne et al., Eur. J. Biochem. 180(1989), 535-545).

Tabelle 2

30

Sequenzgegenüberstellung PRPP-Amidotransferase Proteine aus Arabidopsis thaliana (AtATase1), Bacillus subtilis (BacSu\_purF), Mensch (pur1\_hum) und Nicotiana tabaccum (Ntpur1.1, Ntpur1.2)

35

```

1
AtATase1 ~~~~~ SLN QTILLTPINL SLSSPNPSLN 50
BacSu_purF ~~~~~
Ntpur1 LAPHLLFLLS SFFPPPMAAT VSTASAAATN KSPLSQPLDK PFCSPSQKL.
Ntpur1-2 ~~~~~LS SFFPPPMAAT VSTASAAATN KYPLSQPLDK PFCSLSQKL.
40 pur1_hum ~~~~~
51 100

AtATase1 LHSLS.FLL PSPLLLHSS MESPPTSPLL HHPKNNSHAP FDYHNDEDDE
BacSu_purF ~~~~~ ~~~~~MLAEIK
Ntpur1 ..LSLSPKTL PKPYRTLVT A SSKNPLNDVV SFKKSADNTL DSYFDDDED..
Ntpur1-2 ..LSLSPKTH PKPYRTLIT A SSKNPLNDVI SFKKSADNTL DSYFDDDDD..
45 pur1_hum ~~~~~ ~~~~~MELEEL
101 150

```

AtATase1 KPREECGVVG IYGDPE.... ..ASRLFYLA LHALQHRGQE GAGIVTVSPE

## 18

	BacSu_purF	GLNEECGVFG	IWGHEE....	..APQITYYG	LHSLQHRGQE	GAGIVATDGE
	Ntpur1	KPREECGVVG	IYGDSE....	..ASRLCYLA	LHALLHRGQE	GAGIVAVN.D
	Ntpur1-2	KPREECGVVG	IYGDSE....	..ASRLCYLA	LHALQHRGQE	GAGIVAVN.D
	pur1_hum	GIREECGVFG	CIASGEWPTQ	LDVPHVITLG	LVGLQHRGQE	SAGIVTSDGS
		151				200
5	AtATase1	KV..LQTITG	VGLVSEVFNE	SKLDQL.PGE	FAIAHVRYST	AGASMLKNVQ
	BacSu_purF	K...LTAHKG	QGLITEVFQN	GELSKV.KGK	GAIGHVRYAT	AGGGGYENVQ
	Ntpur1	DV..LKSITG	VGLVSDVFNE	SKLDQL.PGD	MAIGHVWYST	AGSSMLKNVQ
	Ntpur1-2	DV..LKSITG	VGLVSDVFNE	SKLDQL.PGD	MAIGHVRYST	AGSSMLKNVQ
	pur1_hum	SVPTFKSHKG	MGLVNHVFTE	DNLKKLYVSN	LGIGHTRYAT	TGKCELENCQ
		201				250
10	AtATase1	PFV.AGYRFG	SIGVAHNGNL	VNYKTLRAML	EENGSI FNTS	SDTEVVLHLI
	BacSu_purF	PLLFRSQNNG	SLALAHNGNL	VNATQLKQQL	ENQGSIFQTS	SDTEVLAHLI
	Ntpur1	PFV.ANYKFG	SVGVAHNGNL	VNYKLLRGEL	EENGSI FNTS	SDTEVVLHLI
	Ntpur1-2	PFV.ASYKFG	SVGVAHNGNL	VNYKLLRSEL	EENGSI FNTS	SDTEVVLHLI
	pur1_hum	PFVVETLH.G	KIAVAHNGEL	VNAARLRKKL	LRHGIGLSTS	SDSEMITQLL
		251				300
15	AtATase1	AISKAR....	..PFFMRIID	ACEKLQGAYS	MVFVTE DKLV	AVRDPYGFRR
	BacSu_purF	KRSGHF....	..TLKDQIKN	SLSMLKGAYA	FLIMTETEMI	VALDPNGLRP
	Ntpur1	AISKAR....	..PFLLRIVE	ACEKIEGAYS	MVFVTE DKLV	AVRDPHGFRR
	Ntpur1-2	AISKAR....	..PFLLRIVE	ACEKIEGAYS	MVFVTE DKLV	AVRDPHGFRR
20	pur1_hum	AYTPPQEQDD	TPDWVARIKN	LMKEAPTAYS	LLIMHRDVIY	AVRDPYGNRP
		301				350
	AtATase1	LVMGR.....	.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVYPGEV
	BacSu_purF	LSIGM.....	.....M	GD.AYVVASE	TCAFDVVGAT	YLREVEPGEM
	Ntpur1	LVMGR.....	.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVNPGEV
	Ntpur1-2	LVMGR.....	.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVNPGEV
25	pur1_hum	LCIGRLIPVS	DINDKEKKTS	ETEGWVVSSE	SCSFLSIGAR	YYREVLPGEI
		351				400
	AtATase1	LVVDKDG VKS	QCLMPKFEPK	Q...CIFEHI	YFSLPNSIVF	GRSVYESRHH
	BacSu_purF	LIINDEGMKS	ERFSMNINRS	I...CSMEYI	YFSRPDSNID	GINVHSARKN
	Ntpur1	VVVDKDG VHS	IYLMHPHEHK	S...CIFEHI	YFALPNSVVF	GRSVYESRRA
30	Ntpur1-2	VVVDKDG VQS	ICLMPHPERK	S...CIFEHI	YFALPNSVVF	GRSVYESRRA
	pur1_hum	VEISRHNVT	LDIISRSEGN	PVAFCIFEYV	YFARPDSMFE	DQMVTYTVRYR
		401				450
	AtATase1	FGEILATESP	VECDVVIAP	DSGVVAALGY	AAKSGVPFQQ	GLIRSHYVGR
	BacSu_purF	LGKMLAQESA	VEADVVTGVP	DSSISAAIGY	AEATGIPYEL	GLIKNRYVGR
	Ntpur1	FGEILATEAP	VECDVGIAVP	DSGIVAALGY	AAKAGVPFQQ	GLIRSHYVGR
35	Ntpur1-2	FGEILATEAP	VECDVVIAP	DSGVVAALGY	AAKAGVPFQQ	GLIRSHYVGR
	pur1_hum	CGQQLAIEAP	VDADLVSTVP	ESATPAALAY	AGKCGLPYVE	VLCKNRYVGR
		451				500
	AtATase1	TFIEPSQKIR	DFGVK LKLSP	VRGVLEGKRV	VVDDSI VRG	TTSSKIVRLL
	BacSu_purF	TFIQPSQALR	EQGVRMKLSA	VRGVVEGKRV	VMVDDSI VRG	TTSSRI VTML
40	Ntpur1	TFIEPSQKIR	DFGVK LKLSP	VRALLEGKRV	VVDDSI VRG	TTSSKIVRLL
	Ntpur1-2	TFIEPSQKIR	DFGVK LKLSP	VRVLEGKRV	VVDDSI VRG	TTSSKIVRLL
	pur1_hum	TFIQPNMRLR	QLGVAKKFGV	LSDNFKGKRI	VLVDDSI VRG	NTISPIIKLL
		501				550
	AtATase1	REAGAKEVHM	RIASPPIVAS	CYYGVDTPSS	EELISNRLSV	EEINEFIGSD
45	BacSu_purF	REAGATEVHV	KISSPPIAHP	CFYGIDTSTH	EELIASSHSV	GEIRQEIGAD
	Ntpur1	KEAGAKEVHM	RIASPPIIAS	CYYGVDTPSS	DELISNRMSV	EEIKEFIGSD
	Ntpur1-2	KEAGAKEVHM	RIASPPIIAS	CYYGVDTPSS	DELISNRMSV	EEIKEFIGSD
	pur1_hum	KESGAKVHI	RVASPPIKYP	CFMGINIPTK	EELIANKPEF	DHLAEYLGAN

551

600

```

      AtATase1 SLAFLSFDTL KKHL..... .....GK... .DSK.SFCYA
BacSu_purF   TLSFLSVEGL LKGI..... .....GRKYD .DSNCGQCLA
      Ntpur1   SLAFLPMSL NKLL..... .....GN... .DSK.SFCYA
5   Ntpur1-2  SLAFLPMSL NKLL..... .....GN... .DSK.SFCYA
      pur1_hum SVVYLSVEGL VSSVQEGIKF KKQKEKKHDI MIQENGNGLE CFEKSGHCTA
      601                                           650

AtATase1 CFTGDYPVKP TEVKVKRGGG DFIDDGLVGS FENIEAGWVR
BacSu_purF CFTGKYPTEI YQDTVLPHVK EAVLTK~~~~~
10 Ntpur1   CFSGNYPVEP TG.KVKR.IG DFMDDGSLSGD MDSIDGGWLP GSSRVQKTIL
Ntpur1-2 CFSGNYPVEP TG.KVKR.IG DFMDDGSLSGD MDSIDGGWLP GSSRVQKTIL
pur1_hum CLTGKYPVEL EW~~~~~
      651

      AtATase1 ~~~~~
      BacSu_purF ~~~~~
      Ntpur1   NEVRTG
15  Ntpur1-2  NEVRTS
      pur1_hum ~~~~~

```

## Beispiel 2

## 20 Expression von PRPP-Amidotransferase aus Tabak in E.coli

Mit dem Ziel, die Aktivität des durch Ntpur1.2 codierten PRPP-Amidotransferase Enzyms nachzuweisen, wurde Ntpur1.2 in E.coli exprimiert. Dazu wurde in einer (PCR) mit Pfu-Polymerase mit den Oligonucleotiden Jle336: 5'-ttttgctagcgactcgtatttttgacg-3' und

25 Jle337: 5'-aaaaagatctcaggttctaacttcat -3' und Ntpur1.2-DNA als Matrize ein Fragment von 1523 bp amplifiziert. Das erzeugte DNA-Fragment codiert für ein N-terminal um 86 Aminosäuren verkürztes PRPP-Amidotransferase Enzym, welches das anzunehmende Transitpeptid nicht mehr enthält. Diese verkürzte Form des PRPP-Amidotransferase Enzyms beginnt N-terminal mit den Aminosäuren MDSYFDDDD.

30 Mittels der Oligonucleotide wurden eine NheI-Schnittstelle sowie eine BglII-Schnittstelle eingefügt, über die das erzeugte Fragment in den mit NheI und BamHI gespaltenen Expressionsvektor pET11a (Novagen) ligiert wurde.

35 Zur Expression wurde der E.coli Stamm BL21(DE3)Lyss (Novagen) mit dem auf diese Weise erzeugten Konstrukt pETNtpur1.2 transformiert. Nach Übernachtskultur wurde eine Tageskultur auf OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> = 0,7 mit 1mM IPTG induziert. Ein Gesamtzellextrakt wurde nach der Druckaufschlußmethode

40 ("French-Press") in 50mM Tris-HCl, pH 7,4; 150mM NaCl erzeugt. Ein überexprimiertes Protein von ca. 65 kDa wurde nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten. Das Protein wurde zur Erzeugung von Antiseren in Kaninchen injiziert

45 (im Auftrag durchgeführt durch die Firma Eurogentec, Herstal, Belgien).

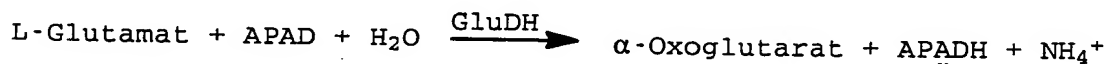
## 20

## Beispiel 3

Testsystem zur Messung der Aktivität pflanzlicher PRPP-Amido-transferase Aktivität

5

Die vorbeschriebene Methode zur Messung pflanzlicher PRPP-Amido-transferase Aktivität nach Reynolds et al. (Archives of Bio-chemistry and Biophysics 229 (1984), 623-631) ist aufgrund der Verwendung radioaktiver Substrate nicht für eine Testung im Hoch-durchsatz geeignet. Es wurde daher auf Basis der bei Shid und Ishii (Journal of Biological Chemistry 66 (1969), 175-181) für PRPP-Amidotransferase aus E.coli beschriebenen Methode ein alternatives Testsystem entwickelt, mit dem die pflanzliche PRPP-Amidotransferase Aktivität im Proteinextrakt anhand der Bildung des Reaktionsproduktes Glutamat nachgewiesen wird. Die Konzentration des entstehenden Glutamats wird dabei durch Umsetzung mit Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) und photometrische Verfolgung der APADH-Bildung bei 363 nm gemessen.



(PRPP = Phosphoribosylpyrophosphat, PRA = Phosphoribosylamin,  
25 APAD = 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid, PRAT = PRPP-Amido-transferase)

Dazu wurde der Reaktionsansatz (s.u.) für bis zu 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5-minütige Inkubation bei  
30 95°C gestoppt.

## Reaktionsansatz:

	375 µL	100 mM	Tris/HCl-Puffer pH 8.0
35	75 µL	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	75 µL	30 mM	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
	75 µL	100 mM	L-Glutamin
	50 µL		H <sub>2</sub> O
	<u>100 µL</u>		Proteinextrakt
40	750 µL		

Der Nachweis des gebildeten Glutamats erfolgte im Nachweisansatz (s.u.) durch photometrische Messung der APADH-Zunahme bei 363 nm nach Zugabe der Glutamat-Dehydrogenase.

45

## Nachweisansatz:

375 µL	100 mM	Tris/HCl-Puffer pH 8.0
75 µL	500 mM	KCl
5 125 µL		H <sub>2</sub> O
75 µL	3 mM	APAD
<u>100 µL</u>		des Reaktionsansatzes
750 µL		

---

- 10 Start der Nachweisreaktion mit 2 µl (ca. 4 Units) Glutamat Dehydrogenase (Sigma).

Das Testsystem eignet sich in besonderer Weise zur Messung der PRPP-Amidotransferase Aktivität aus Pflanzenmaterial und in Expressionsextrakten zum Beispiel aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen.

## Beispiel 4

- 20 Funktionale Expression von PRPP-Amidotransferase aus Tabak in Insektenzellen

Zur Expression von Ntpur1.1 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen wurde das Bac-to-Bac Expressionssystem der Firma GibcoBRL eingesetzt. Dazu wurde Ntpur1.1 für eine PCR eingesetzt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/µl Ntpur1.1 DNA, 0,5 µM der Oligonukleotide 5'-tat agg atc cat gga ctc cta ttt tga cg-3' und 5'-atg aat tct agc tgg ttc taa ctt c-3', 200 µM Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 0.04 U/µl Pfu Polymerase (Stratagene) und wurde auf

30 Pufferbedingungen nach Angaben des Herstellers eingestellt.

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

## Step 1:

- 35 Denaturierungstemperatur: 95°C, 0,5 min  
Anlagerungstemperatur: 40°C, 0,5 min  
Elongationstemperatur: 72°C, 2 min  
Anzahl der Zyklen für Step 1: 2

40

## Step 2:

- Denaturierungstemperatur: 95°C, 0,5 min  
Anlagerungstemperatur: 50°C, 0,5 min  
45 Elongationstemperatur: 72°C, 3 min  
Anzahl der Zyklen für Step 2: 25



## 22

Das PCR-Produkt wurde in den mit StuI geschnittenen Vector pFast-Bac1 (GibcoBRL) ligiert. Die korrekte Orientierung des Inserts wurde durch Kontrollverdau mit KpnI sichergestellt. Der erhaltene Transfervector pFastBacNtpur1.2 wurde nach Herstellerangaben zur Erzeugung rekombinanter Baculoviren mittels Sf21 Insektenzellen (Invitrogen) verwendet. Mit dem rekombinanten Baculovirus (BvNtpur1.2) wurden Sf21 Insektenzellen infiziert. Die Zellen wurden nach 2-4 Tagen durch Zentrifugation geerntet. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte im Gesamtextrakt ein Protein von ca. 54kDal entsprechend der erwarteten Größe der PRPP-Amidotransferase identifiziert werden. Ein Gesamtzellextrakt wurde nach der Druckaufschlußmethode ("French-Press") in Extraktionspuffer (100 mM HEPES pH 8,0; 2,5 mM EDTA; 10 % Glycerol; 20 mM DTE; 0,2 mM PEFA-Block) erzeugt und nach Entsalzung über eine PD10-Säule (Pharmacia) zur Messung der PRPP-Amidotransferase Aktivität im beschriebenen Assay (siehe Beispiel 3) verwendet.

## Beispiel 5

## 20 Erzeugung von Vektoren zur Pflanzentransformation

Zur Erzeugung binärer Vektoren für die Pflanzentransformation wurde der Klon Ntpur1.1 mit SmaI und EcoRV gespalten und ein 1482 bp umfassendes Fragment isoliert, welches in den mit SmaI gespaltenen Vektro pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66(1990), 221-230) ligiert wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Antisense- bzw. Sense-Konstrukte wurden mit pBinAR-Ntpur1A bzw. pBinAR-Ntpur1 bezeichnet, siehe Abbildung 1.

## 30 Beispiel 6

## Erzeugung transgener Tabakpflanzen

Die Plasmide pBinAR-Ntpur1A bzw. pBinAR-Ntpur1 wurden in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788). Zur Transformation von Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog Physiol. Plant. 15(1962), 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Ka-

## 23

namycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphtylelessigsäure und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

5

Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden

hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 60% Luftfeuchte auf PRPP-Ami-

10 dotransferase Expression und -Aktivität sowie auf veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht. Veränderte Nukleotidgehalte können z.B. nach der Methode von Stitt et al., FEBS Letters 145(1982), 217-222 bestimmt werden.

## 15 Beispiel 7

## Analyse transgener Pflanzen

Transgene Pflanzen, die mit dem Konstrukt mit pBinAR-Ntpur1  
20 transformiert wurden sind gekennzeichnet durch ein in unterschiedlichem Maße verringertes Wachstum sowie ein großflächiges Ausbleichen der Blätter im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen. Die RNA-Analyse durch die Northernblot-Technik wies in transgenen Linien mit dem beschriebenen Phänotyp eine  
25 verringerte Menge an Ntpur1.1-RNA auf.

Um die Korellation zur Wachstumsreduktion zu testen, wurde die PRPP-Amidotransferase Aktivität in den transgenen Linien gemessen und mit jener in untransformierten Kontrollen verglichen. Dazu  
30 wurden je ca. 30 g Blätter von ca. 20 cm hohen Pflanzen mit 50 ml Extraktionspuffer bei +4 °C homogenisiert.

## Extraktionspuffer:

35 100 mM HEPES pH 8,0  
2,5 mM EDTA  
10 % Glycerol  
20 mM DTE  
0,2 mM PEFA-Block (40mM)

40

Der Aufschlußextrakt wurde durch Miracloth (Calbiochem, Bad Soden) filtriert und bei 16000 rpm in der Sorval Zentrifuge zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bei 4°C gefällt. Die 30 % - 60 %-Stufe wurde im Extraktionspuffer  
45 solubilisiert und über eine PD-10-Säule (Pharmacia, Schweden) entsalzt. Der so gewonnene Extrakt ist mindestens 24 h stabil, und kann bei -20 °C nach Zusatz von Glycerol (50% Endkonzen-

## 24

tration) für längere Zeit gelagert werden. Der Extrakt kann direkt zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden.

Diese Daten stellen einen direkten Zusammenhang zwischen verringerter PRPP-Amidotransferase Aktivität und verringertem Wachstum der Tabakpflanzen her und weisen daher PRPP-Amidotransferase erstmals als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

---

Beispiel 8

10

Suche nach Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase Aktivität

Zur Suche nach Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase Aktivität kann der in Beispiel 3 beschriebene in vitro Assay mit Hochdurchsatzmethoden verwendet werden. Die PRPP-Amidotransferase Aktivität kann dazu aus Pflanzengewebe präpariert werden, siehe Beispiel 7. Alternativ kann eine pflanzliche PRPP-Amidotransferase in E.coli, Insektenzellen oder einem anderen geeigneten Expressionssystem exprimiert werden. Auf diese Weise wurden bekannte PRPP-Amidotransferase Inhibitoren - wie Glutaminantagonisten - identifiziert.

25

30

35

40

45

# SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

<130> NAE991125

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1879

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(1767)

<400> 1

ctagcccccc acttgctttt ccttctgtcc tccttttttc caccgccc atg gcc gcc 57  
Met Ala Ala

1

acc gtc tcc acc gcc tct gcc gcc gcc acc aat aaa tct cct ctt tcg 105  
Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Ser Pro Leu Ser  
5 10 15

ag ccc ctc gac aaa ccc ttt tgc tcc cca tct caa aag ctc tta tct 153  
Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Pro Ser Gln Lys Leu Leu Ser  
20 25 30 35

tta tcc cct aaa acc ctc cca aaa ccc tat aga act ctc gtc acc gca 201  
Leu Ser Pro Lys Thr Leu Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu Val Thr Ala  
40 45 50

tct tcc aaa aac ccc tta aac gac gtc gtt tcg ttt aag aaa tca gct 249  
Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Val Ser Phe Lys Lys Ser Ala  
55 60 65

gac aat aca ttg gac tcg tat ttt gac gat gaa gac aaa ccc cgt gaa 297  
Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Glu Asp Lys Pro Arg Glu  
70 75 80

gag tgt ggc gtt gtg ggc atc tat ggc gac tca gaa gct tca cgc ctt	345
Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala Ser Arg Leu	
85 90 95	
tgc tat tta gca ctt cac gcg ctt cta cac cgt ggc caa gaa ggc gcc	393
Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Leu His Arg Gly Gln Glu Gly Ala	
100 105 110 115	
ggc att gtc gcc gtt aac gac gac gtt ctt aag tca att aca ggt gtt	441
Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile Thr Gly Val	
120 125 130	
ggg tta gta tcc gac gtg ttc aat gag tca aag ctt gac caa ctc cct	489
Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp Gln Leu Pro	
135 140 145	
gt gac atg gca att ggc cac gtc tgg tac tct act gct ggc tct tct	537
Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Trp Tyr Ser Thr Ala Gly Ser Ser	
150 155 160	
atg tta aaa aat gtt cag cct ttt gtt gct aat tat aaa ttt ggg tca	585
Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Asn Tyr Lys Phe Gly Ser	
165 170 175	
gtt ggt gtt gcc cat aat ggt aat tta gtg aat tat aag tta ctg cgt	633
Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys Leu Leu Arg	
180 185 190 195	
ggt gaa cta gaa gag aat ggg tca att ttt aat acg agt tct gat act	681
Gly Glu Leu Glu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser Ser Asp Thr	
200 205 210	
aa gtg gta ctt cac ctt att gct ata tcg aaa gct agg cct ttt tta	729
Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg Pro Phe Leu	
215 220 225	
ttg agg att gtt gag gct tgt gaa aaa att gaa ggt gct tat tct atg	777
Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala Tyr Ser Met	
230 235 240	
gtg ttt gtt act gag gat aag ttg gtt gcc gta agg gat cct cat ggg	825
Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp Pro His Gly	
245 250 255	
ttt agg cca ttg gtt atg ggt agg aga agt aat ggt gct gtt gtt ttt	873
Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala Val Val Phe	
260 265 270 275	

gcg tcg gag acg tgt gct ttg gat ttg att gag gct act tat gag agg	921
Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Arg	
280 285 290	
gag gtg aat cct ggt gag gtt gtt gtt gtg gat aaa gat ggg gtt cat	969
Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Val Asp Lys Asp Gly Val His	
295 300 305	
tct att tat ttg atg cct cat ccc gag cat aaa tct tgt atc ttt gag	1017
Ser Ile Tyr Leu Met Pro His Pro Glu His Lys Ser Cys Ile Phe Glu	
310 315 320	
cat att tac ttt gct ctg cct aat tcg gtc gtg ttt ggg agg tct gtg	1065
His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly Arg Ser Val	
325 330 335	
tac gag tct agg cgt gct ttt gga gag att ctt gcg act gaa gct ccc	1113
Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr Glu Ala Pro	
340 345 350 355	
gta gaa tgt gat gtt ggg ata gca gtt cct gat tcg ggt atc gtg gct	1161
Val Glu Cys Asp Val Gly Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly Ile Val Ala	
360 365 370	
gcg ctc ggt tat gct gct aaa gcg ggg gta ccg ttt caa caa ggt ttg	1209
Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln Gln Gly Leu	
375 380 385	
ata agg tcg cat tat gtt ggt agg aca ttt atc gag ccg tcg cag aag	1257
Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro Ser Gln Lys	
390 395 400	
ata agg gat ttc ggg gtg aag ctt aag ttg tca cca gtt agg gca tta	1305
Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val Arg Ala Leu	
405 410 415	
ttg gag ggg aaa agg gtt gtg gtc gtg gac gat tca atc gtt aga ggg	1353
Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile Val Arg Gly	
420 425 430 435	
acg acc tcg tcc aag att gtg agg ttg ttg aag gag gcg ggt gcg aaa	1401
Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala Gly Ala Lys	
440 445 450	
gag gtt cat atg agg att gca agc cca cca att ata gct tct tgt tat	1449
Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala Ser Cys Tyr	
455 460 465	

tat gga gtg gat act cct agt tca gat gag ctg ata tca aat agg atg 1497  
 Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser Asn Arg Met  
 470 475 480

agt gtg gag gag att aag gag ttc att gga tcg gat tcg ctt gct ttt 1545  
 Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser Leu Ala Phe  
 485 490 495

ctg cca atg gat agc ttg aat aag ttg tta ggc aat gat tct aaa agc 1593  
 Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp Ser Lys Ser  
 500 505 510 515

ttt tgc tat gct tgc ttt tcg ggc aat tac ccg gtc gag ccg acg ggt 1641  
 Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu Pro Thr Gly  
 520 525 530

aag gtt aaa agg att ggg gat ttc atg gat gat gga tta agt gga gat 1689  
 Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu Ser Gly Asp  
 535 540 545

atg gat tcc att gat ggt ggt tgg cta cca gga agt agt agg gtt caa 1737  
 Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser Arg Val Gln  
 550 555 560

aag act atc ttg aat gaa gtt aga acc ggc taaactttct tttccatggt 1787  
 Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Gly  
 565 570

tgcttttagtt tttgcttttg atttctaattg cttgactata gaaattataa gtttcaatga 1847

agtctctttt tctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1879

<210> 2

<211> 573

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Ser  
 1 5 10 15

Pro Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Pro Ser Gln Lys  
 20 25 30

Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr Leu Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu  
 35 40 45

Val Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Val Ser Phe Lys  
50 55 60

Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Glu Asp Lys  
65 70 75 80

Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala  
85 90 95

Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Leu His Arg Gly Gln  
100 105 110

Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile  
115 120 125

Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp  
130 135 140

Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Trp Tyr Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Asn Tyr Lys  
165 170 175

Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys  
180 185 190

Leu Leu Arg Gly Glu Leu Glu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser  
195 200 205

Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg  
210 215 220

Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala  
225 230 235 240

Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp  
245 250 255

Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala  
260 265 270

Val Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr  
275 280 285

Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Val Asp Lys Asp  
290 295 300



Gly Val His Ser Ile Tyr Leu Met Pro His Pro Glu His Lys Ser Cys			
305	310	315	320
Ile Phe Glu His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly			
	325	330	335
Arg Ser Val Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr			
	340	345	350
Glu Ala Pro Val Glu Cys Asp Val Gly Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly			
	355	360	365
Ile Val Ala Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln			
	370	375	380
Gln Gly Leu Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro			
	385	390	395
Ser Gln Lys Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val			
	405	410	415
Arg Ala Leu Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile			
	420	425	430
Val Arg Gly Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala			
	435	440	445
Gly Ala Lys Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala			
	450	455	460
Ser Cys Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser			
	465	470	475
Asn Arg Met Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser			
	485	490	495
Leu Ala Phe Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp			
	500	505	510
Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu			
	515	520	525
Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu			
	530	535	540
Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser			
	545	550	555
			560

Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Gly  
565 570

<210> 3

<211> 1869

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(1743)

<400> 3

```

ctgtctcat ttttcccacc accc atg gcc gcc acc gtc tcc acc gcc tct 51
Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser
1 5

gcc gcc gcc acc aac aaa tat cct ctt tca cag ccc ctt gac aaa ccc 99
Ala Ala Ala Thr Asn Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro
10 15 20 25

ttt tgc tcc cta tct caa aag ctc tta tct tta tcc cct aaa acc cat 147
Phe Cys Ser Leu Ser Gln Lys Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr His
30 35 40

cct aaa ccc tac aga act ctc atc acc gcc tct tcc aaa aac ccc tta 195
Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu Ile Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu
45 50 55

aac gac gtc att tcg ttt aag aaa tca gct gac aat acc ttg gac tcc 243
Asn Asp Val Ile Ser Phe Lys Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser
60 65 70

tat ttt gac gat gac gat aaa ccc cgt gaa gag tgc ggc gtt gtg ggc 291
Tyr Phe Asp Asp Asp Asp Lys Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly
75 80 85

atc tat ggc gac tca gaa gct tca cgc ctt tgc tat tta gca ctt cac 339
Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His
90 95 100 105

gcg ctt caa cac cgt gcc caa gaa gcc gcc gcc att gtc gcc gtt aac 387
Ala Leu Gln His Arg Gly Gln Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn
110 115 120

gac gac gtt ctt aag tca att aca ggt gtt ggg tta gta tcc gac gtg 435

```

Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val	
125	130 135
ttc aat gag tca aag ctt gac caa ctc cct ggt gac atg gca att ggc	483
Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly	
140	145 150
cac gta agg tac tct act gct ggc tct tct atg tta aaa aat gtt cag	531
His Val Arg Tyr Ser Thr Ala Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln	
155	160 165
cct ttt gtt gct agt tat aaa ttt ggg tca gtt ggt gtt gcc cat aat	579
Pro Phe Val Ala Ser Tyr Lys Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn	
170	175 180 185
ggt aat tta gtg aat tat aag tta ctg cgt agt gaa cta gag gaa aat	627
Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys Leu Leu Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asn	
190	195 200
ggg tca att ttt aat aca agt tct gat act gag gtt gta ctt cac ctt	675
Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu	
205	210 215
att gct ata tct aaa gct agg cca ttt tta ttg agg att gtt gag gct	723
Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala	
220	225 230
tgt gaa aaa att gaa ggt gct tat tct atg gtg ttt gtt act gag gat	771
Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp	
235	240 245
aag ttg gtt gcc gta agg gat cct cat ggg ttt agg cca ttg gtt atg	819
Lys Leu Val Ala Val Arg Asp Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met	
250	255 260 265
ggt agg aga agt aat ggt gct gtt gtt ttc gcg tct gag acg tgt gct	867
Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala Val Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala	
270	275 280
ttg gat ttg att gag gct act tat gag agg gag gtg aat cct ggt gag	915
Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu	
285	290 295
gtt gtt gtt gtg gat aaa gat ggg gtt cag tct att tgt ttg atg cct	963
Val Val Val Val Asp Lys Asp Gly Val Gln Ser Ile Cys Leu Met Pro	
300	305 310
cat cct gag cgt aaa tct tgt atc ttt gag cat att tac ttt gct ctg	1011

His Pro Glu Arg Lys Ser Cys Ile Phe Glu His Ile Tyr Phe Ala Leu  
 315 320 325

cct aat tcg gtc gtg ttt ggg agg tct gtg tac gag tct agg cgt gct 1059  
 Pro Asn Ser Val Val Phe Gly Arg Ser Val Tyr Glu Ser Arg Arg Ala  
 330 335 340 345

ttc ggg gag att ctt gct act gaa gct ccc gtg gaa tgt gat gtt gtg 1107  
 Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr Glu Ala Pro Val Glu Cys Asp Val Val  
 350 355 360

ata gca gtt cct gac tcg ggt gtc gtg gct gcg ctc ggt tat gct gct 1155  
 Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly Val Val Ala Ala Leu Gly Tyr Ala Ala  
 365 370 375

aaa gca ggg gta ccg ttt caa caa ggt ttg att agg tcg cat tat gtt 1203  
 Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln Gln Gly Leu Ile Arg Ser His Tyr Val  
 380 385 390

ggt agg acg ttc atc gag cca tcg cag aag ata agg gat ttc ggg gtg 1251  
 Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro Ser Gln Lys Ile Arg Asp Phe Gly Val  
 395 400 405

aag ctt aag ctg tcg ccg gtt agg gcg gtg ttg gag gga aaa aga gtt 1299  
 Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val Arg Ala Val Leu Glu Gly Lys Arg Val  
 410 415 420 425

gtg gtc gtg gat gat tcg atc gtt aga gga acg acc tcg tcc aag att 1347  
 Val Val Val Asp Asp Ser Ile Val Arg Gly Thr Thr Ser Ser Lys Ile  
 430 435 440

gtg agg ctg tta aag gag gcg ggt gcg aaa gag gtt cat atg agg att 1395  
 Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala Gly Ala Lys Glu Val His Met Arg Ile  
 445 450 455

gca agc cca cca att ata gct tct tgt tat tat gga gtg gat act cct 1443  
 Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala Ser Cys Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Pro  
 460 465 470

agt tca gat gag ttg ata tca aat agg atg agt gtg gag gag att aag 1491  
 Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser Asn Arg Met Ser Val Glu Glu Ile Lys  
 475 480 485

gag ttc att gga tcg gat tcg ctt gct ttt ctg cca atg gat agc ttg 1539  
 Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser Leu Ala Phe Leu Pro Met Asp Ser Leu  
 490 495 500 505

aat aag ctc tta ggc aat gat tct aaa agc ttt tgc tat gct tgc ttt 1587

Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe  
 510 515 520

tcg ggc aat tac cca gtc gag ccg acg ggt aag gtt aaa agg ata ggg 1635  
 Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly  
 525 530 535

gat ttc atg gat gat gga tta agt gga gat atg gat tcc att gat ggt 1683  
 Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly  
 540 545 550

gga tgg cta cca gga agt agt agg gtt caa aag act atc ttg aat gaa 1731  
 Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu  
 555 560 565

gtt aga acc agc taaactttct tttccatggt tgcttttagtt tttgctttgg 1783  
 Val Arg Thr Ser  
 570

atttctaatag cttgaccata gaaattataa gtttcaatga agtctctttt tctatttgga 1843  
 atgccacatg attctactga tctatg 1869

<210> 4  
 <211> 573  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 4  
 Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Tyr  
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Leu Ser Gln Lys  
 20 25 30

Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr His Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu  
 35 40 45

Ile Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Ile Ser Phe Lys  
 50 55 60

Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Asp Lys  
 65 70 75 80

Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala  
 85 90 95

Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Gln His Arg Gly Gln  
100 105 110

Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile  
115 120 125

Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp  
130 135 140

Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Arg Tyr Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Ser Tyr Lys  
165 170 175

Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys  
180 185 190

Leu Leu Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser  
195 200 205

Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg  
210 215 220

Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala  
225 230 235 240

Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp  
245 250 255

Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala  
260 265 270

Al Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr  
275 280 285

Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Val Asp Lys Asp  
290 295 300

Gly Val Gln Ser Ile Cys Leu Met Pro His Pro Glu Arg Lys Ser Cys  
305 310 315 320

Ile Phe Glu His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly  
325 330 335

Arg Ser Val Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr  
340 345 350

Glu Ala Pro Val Glu Cys Asp Val Val Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly  
355 360 365

Val Val Ala Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln  
370 375 380

Gln Gly Leu Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro  
385 390 395 400

---

Ser Gln Lys Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val  
405 410 415

Arg Ala Val Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile  
420 425 430

Val Arg Gly Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala  
435 440 445

Gly Ala Lys Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala  
450 455 460

Ser Cys Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser  
465 470 475 480

Asn Arg Met Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser  
485 490 495

Leu Ala Phe Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp  
500 505 510

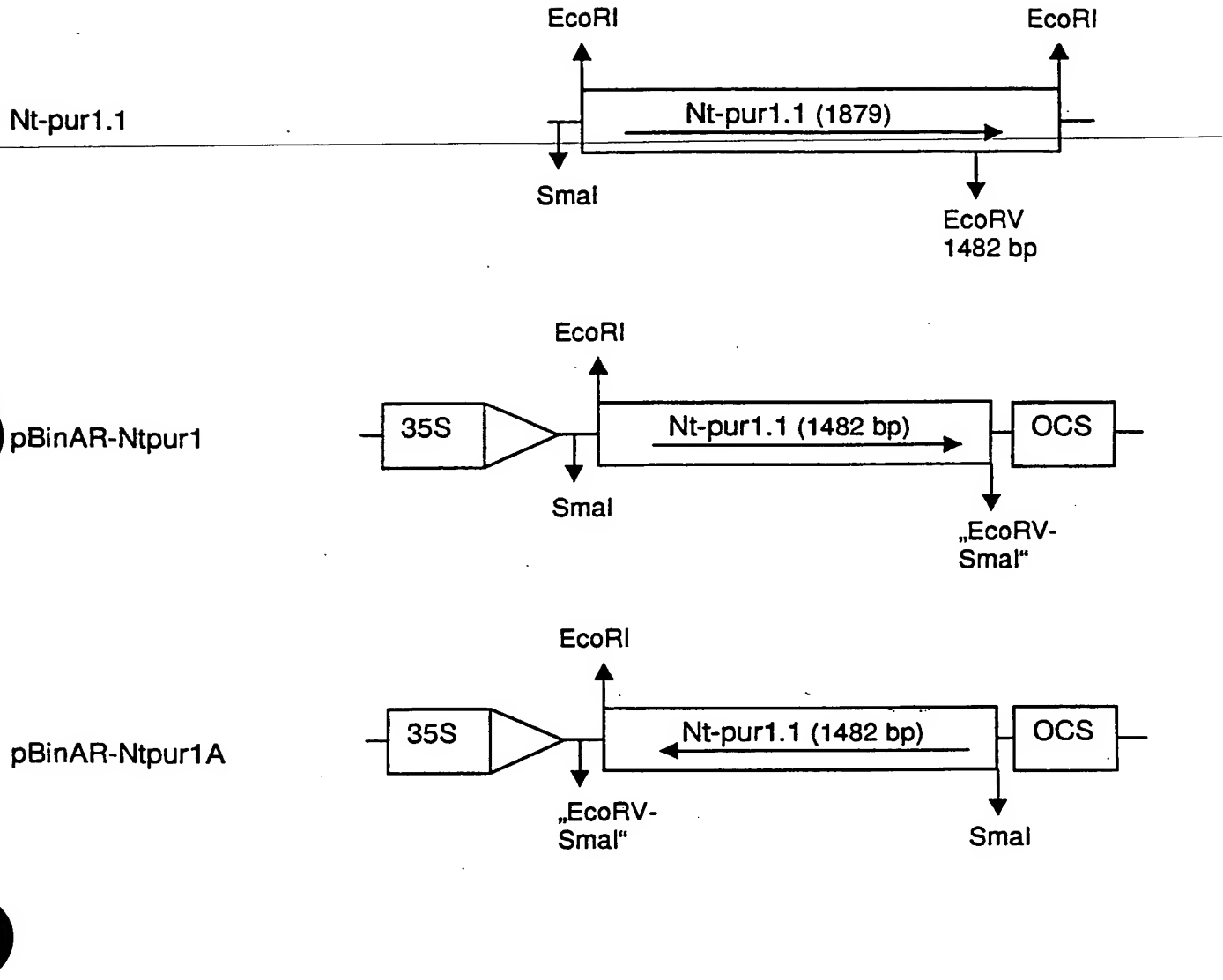
Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu  
515 520 525

Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu  
530 535 540

Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser  
545 550 555 560

Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Ser  
565 570

Abbildung 1





## PRPP-Amidotransferase

## Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit PRPP-Amidotransferase (EC 2.4.2.14) Aktivität. ~~Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäuren zur Herstellung eines Testsystems.~~

10

15

20

25

30

35

40

45



—